

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/76, 33/68, 33/566		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/26294 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Juni 1998 (18.06.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/06767 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. Dezember 1997 (03.12.97)			(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten: 196 51 093.7 9. Dezember 1996 (09.12.96) DE			Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): B.R.A.H.M.S DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Komturstrasse 19-20, D-12099 Berlin (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): BERGMANN, Andreas [DE/DE]; Baumläuferweg 47, D-12351 Berlin (DE). STRUCK, Joachim [DE/DE]; Holsteinische Strasse 28, D-12161 Berlin (DE).			
(74) Anwälte: ANDRAE, Steffen; Andrae Flach Haug Kneissl Bauer Schneider, Balanstrasse 55, D-81541 München (DE) usw.			

(54) Title: RECEPTOR BINDING ASSAY FOR DETECTING TSH-RECEPTOR AUTO-ANTIBODIES

(54) Bezeichnung: REZEPTORBINDUNGSASSAY ZUM NACHWEIS VON TSH-REZEPTOR-AUTOANTIKÖRPERN

(57) Abstract

In a competitive receptor binding assay for detecting TSH-receptor auto-antibodies in a biological sample, the sample is reacted in a reaction mixture which contains (i) a TSH-receptor or TSH-receptor preparation; (ii) a primary competitor, for example labelled TSH; and (iii) an agent for separating a complex composed of the TSH-receptor and the elements bound thereto of the reaction mixture from the liquid phase. According to the invention, the reaction is carried out in the presence of at least one monoclonal or polyclonal antibody specific against a partial peptide sequence of the TSH-receptor. This specific antibody is used to immobilise a complex of TSH-receptor and primary competitor and/or as secondary competitor for another part of the TSH-receptor auto-antibodies expected in a sample. The primary or secondary competitors are or can be selectively labelled.

(57) Zusammenfassung

Kompetitiver Rezeptorbundungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in einer biologischen Probe, bei dem man die Probe in einer Reaktionsmischung mit (i) einer TSH-Rezeptor oder TSH-Rezeptor-Präparation, (ii) einem primären Kompetitor z.B. markiertem TSH, und (iii) einem Mittel für die Abtrennung eines Komplexes aus dem TSH-Rezeptor und daran gebundenen Bestandteilen der Reaktionsmischung von der flüssigen Phase umsetzt, wobei man erfahrungsgemäß die Umsetzung ferner in Gegenwart mindestens eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers durchführt, der spezifisch gegen eine Peptid-Teilsequenz des TSH-Rezeptors gerichtet ist, und wobei dieser spezifische Antikörper als Mittel zur Immobilisierung eines Komplexes aus TSH-Rezeptor und primärem Kompetitor und/oder als sekundärer Kompetitor für einen weiteren Teil der in einer Probe zu erwartenden TSH-Rezeptor-Autoantikörper eingesetzt wird, wobei der primäre oder der sekundäre Kompetitor markiert oder selektiv markierbar ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

REZEPTORBINDUNGSASSAY ZUM NACHWEIS VON TSH-REZEPTOR-AUTOANTIKÖRPERN

10

15

Die vorliegende Erfindung betrifft einen kompetitiven Rezeptorbundungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern, die bei Schilddrüsen-Autoimmunerkrankungen, insbesondere beim Morbus Basedow, auftreten.

20

Es ist bekannt, daß zahlreiche Erkrankungen, an denen die Schilddrüse beteiligt ist, Autoimmunerkrankungen sind, bei denen Autoantikörper gegen molekulare Strukturen der Schilddrüse gebildet werden, die im Zusammenhang mit der Erkrankung beginnen, als Autoantigene zu wirken. Die wichtigsten bekannten Autoantigene der Schilddrüse sind dabei Thyreoglobulin (Tg), die Schilddrüsenperoxidase (TPO) und insbesondere der TSH-Rezeptor (TSHr) (vgl. Furmaniak J et al., Autoimmunity 1990, Vol. 7, S. 63-80).

25

Der TSH-Rezeptor ist ein in der Schilddrüsenmembran lokalisierte Rezeptor, an den das von der Hypophyse ausgeschüttete Hormon TSH (Thyroid-stimulierendes Hormon oder Thyrotropin)

- 2 -

bindet und dadurch die Ausschüttung der eigentlichen Schilddrüsenhormone, insbesondere des Thyroxins, auslöst. Der TSH-Rezeptor gehört zur Rezeptor-Familie der G-Protein-gekoppelten Glykoprotein-Rezeptoren mit einer großen aminoterminalen extrazellulären Domäne, zu der auch der LH/CG- und der FSH-Rezeptor gehören. Eine Aufklärung der chemischen Struktur des TSH-Rezeptors, d.h. der Sequenz der für ihn codierenden DNA sowie der daraus ableitbaren Aminosäuresequenz des Rezeptors selbst, gelang Ende 1989 (vgl. Libert F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1250-1255; Nagayama Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1184-1190; vgl. auch EP-A-0433509 bzw. WO-A-91/09121; sowie WO-A-91/09137; WO-A-91/10735 und WO-A-91/03483; ferner Yuji Nagayama & Basil Rapoport, in: Molecular Endocrinology, Vol. 6 No. 2, S. 145-156 und die darin zitierte Literatur).

Es ist allgemein bekannt, daß bei der als Morbus Basedow (englisch: Graves' disease) bekannten Schilddrüsen-Autoimmunerkrankung stimulierende Autoantikörper eine Rolle spielen, die gegen der TSH-Rezeptor gebildet werden und mit diesem so wechselwirken, daß die Schilddrüse stimuliert wird, was sich als Schilddrüsenüberfunktion (Hyperthyreose) äußert. Die Bestimmung von Autoantikörpern gegen den TSH-Rezeptor hat somit für die Diagnose des Morbus Basedow eine erhebliche klinische Bedeutung.

Abgesehen von Bestimmungsverfahren, bei denen Versuchstiere oder spezielle Zellkulturen eine Rolle spielen und die heute vor allem von historischem Interesse sind (vgl. Schumm-Draeger et al., Akt. Endokr. Stoffw. 10 (1989), S. 90-102)), können TSH-Rezeptor-Autoantikörper bisher im wesentlichen nach zwei Verfahrensprinzipien bestimmt werden (vgl. Morgenthaler N.G. et al., Exp Clin Endocrinol Diabetes 104 (1996) Suppl 4, S.56-59):

35

Bei Zellstimulationstests äußert sich die Anwesenheit von stimulierenden TSH-Rezeptor-Autoantikörpern, die in der

- 3 -

Literatur häufig mit der Abkürzung TSI (TSI = thyroid stimulating immunoglobulins) bezeichnet werden, dadurch, daß bestimmte Funktionen von geeigneten Zellen, die in ihrer Zellmembran natürliche oder rekombinante TSH-Rezeptoren aufweisen und mit einer Autoantikörper enthaltenden Probe in Kontakt kommen, durch Stimulation ausgelöst oder verstärkt werden, insbesondere die Bildung von cAMP (cyclischem Adenosinmonophosphat). Bei diesen auch als Bioassays bezeichneten Tests wird selektiv die stimulierende Wirkung gemessen, die Messung ist jedoch außerordentlich aufwendig und daher für die klinische Routine-diagnostik wenig geeignet.

Alternativ dazu können Autoantikörper auch unter Verwendung von kompetitiven Rezeptorbindungsassays, insbesondere Radiorezeptorassays, bestimmt werden, z.B. unter Verwendung des TRAK Assay® der B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH. Zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern wird nach diesem herkömmlichen Verfahren so vorgegangen, daß man die zu bestimmenden Autoantikörper aus einer Serumprobe in flüssiger Phase mit einem radioaktiv markierten bovinen TSH-Kompetitor um die Bindungsstellen eines Detergens-solubilisierten porcinen TSH-Rezeptors konkurrieren läßt (vgl. Southgate, K. et al., Clin. Endocrinol. (Oxford) 20, 539-541 (1984); Matsuba T. et al., J.Biochem.118, S.265-270 (1995); EP 719 858 A2; Produktinformation zum TRAK-Assay® der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH). Um das an die Rezeptor-Präparation gebundene markierte TSH zu bestimmen, wird nach Abschluß der Inkubation der TSH-Rezeptor mit einem Fällungsreagens und einem anschließenden Zentrifugierschritt von der flüssigen Phase abgetrennt. Die Bestimmung des Rezeptor-gebundenen markierten TSH erfolgt durch Messung der im Sediment gebundenen Radioaktivität. Da die Bestimmung auf einer Konkurrenz (Kompetition) zwischen markiertem TSH und den zu bestimmenden Autoantikörpern um gemeinsame Bindungsstellen auf dem TSH-Rezeptor beruht, werden bei diesem Verfahren alle solchen und nur solche Autoantikörper erfaßt, die tatsächlich mit TSH kompetieren. Solche kompetierenden, zur Inhibierung der TSH-Bindung befähigten Autoantikörper werden in der Literatur

- 4 -

auch als TBII (TBII = thyrotropin-binding inhibitory immunoglobulin) bezeichnet, und das Ausmaß ihrer Aktivität wird auch als prozentuale sogenannte TBII-Aktivität angegeben.

5 Es ist nunmehr seit längerem bekannt, daß bei Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse heterogene Autoantikörperpopulationn unterschiedlicher Zusammensetzung gebildet werden. Dabei sind die stimulierenden und die mit TSH kompetierenden Autoantikörper nur teilweise identisch, d.h. es gibt stimulierende Autoantikörper, die nicht mit TSH kompetieren, und es gibt auch mit TSH kompetierende Autoantikörper, die nicht stimulierend wirken. Außerdem können auch noch Autoantikörper vorhanden sein, die weder stimulierend wirken, noch mit TSH kompetieren (vgl. z.B. Ludgate M et al., Mol. Cell. Endocrinol. 10 73 (1990), R13-R18; Filetti S et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 72; S.1096-1101, 1991; Morgenthaler N.G. et al., Exp Clin Endocrinol Diabetes 104 (1996) Suppl 4, S.56-59 und darin zitierte Literatur). Das hat zur Folge, daß nur bei etwa 80% bis 90% der Morbus Basedow Patienten mit Hilfe von Radiorezeptorassays Autoantikörper nachweisbar sind (vgl. z.B. Rationelle Diagnostik in der Endokrinologie, Thieme Verlag, S. 49, Absatz: TSH-Rezeptorautoantikörper (TSH-RAK); oder auch Ropars A et al., Cell. Immunol. 161, S.262-269 (1995); Ohmori M et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, No.1 (1991), S.399-403; Endo T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, No.3 15 (1991), S.1035-1041; Gupta MK, Clin. Biochem. 25, S. 193-199 (1992)). Da die Nichterfassung eines Teils der beim Morbus Basedow vorkommenden Autoantikörper ursächlich mit dem Meßprinzip der bisherigen kompetitiven Radiorezeptorassays verknüpft ist, wurde schon vorgeschlagen, trotz des erheblichen Aufwands eine ergänzende Bioassay-Messung zur Bestimmung stimulierender TSI Autoantikörper durchzuführen, wenn eine Diskrepanz zwischen dem klinischen Bild eines Morbus Basedow Patienten und dem Meßergebnis der Bestimmung kompetierender 20 TBII Autoantikörper erkennbar wird (Derwahl M et al., Exp. Clin. Endocrinol. 100 (1992), S. 75-79).

25

30

35

- 5 -

Außer der beschriebenen eingeschränkten klinischen Wertigkeit weisen die bisher bekannten kompetitiven Radiorezeptorassays zum Nachweis von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern grundsätzliche Nachteile praktischer Natur auf, die darauf zurückzuführen sind, daß die Bindungsfähigkeit von TSH-Rezeptorpräparationen generell sehr empfindlich auf Veränderungen des Rezeptors oder des von ihm gebundenen Biomoleküls reagiert. Die Bindung von Biomolekülen von peptidischer oder proteinischer Natur, z.B. von Hormonen oder auch Autoantikörpern, an Rezeptoren ist in der Regel sehr komplexer Natur, und die Ausbildung einer spezifischen Bindung zwischen Rezeptor und Biomolekül ist sehr viel empfindlicher gegenüber strukturellen Veränderungen insbesondere des Rezeptors, als das bei einem üblichen Bindungspaar Antigen/Antikörper der Fall ist, das Grundlage der meisten Immunoassays ist, bei denen Rezeptoren keine Rolle spielen.

Versuche, den TSH-Rezeptor zu immobilisieren und/oder zu markieren, führten in der Regel zu strukturellen Veränderungen, die die Funktionalität des Rezeptors stark beeinträchtigen. Das hat zur Folge, daß zahlreiche Assay-Grundtypen, die bei Immunoassays unter Ausnutzung einer Antikörper/Antigen-Bindung zur Verfügung stehen, insbesondere solche, bei denen mit immobilisierten Bindungspartnern gearbeitet wird und am Ende der Messung direkt die Konzentration einer an eine Festphase gebundenen Markierung bestimmt wird oder bei denen zur Markierung voluminöse Moleküle wie Enzyme, Enzymsubstrate oder Chemilumineszenzlabel verwendet werden, für die Durchführung von Rezeptorbindungsassays zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in der Praxis bisher nicht genutzt werden können. Da die Messung einer an eine Festphase gebundenen Markierung Grundlage der meisten Assay-Automaten für Reihenmessungen ist, sind die bekannten Assays zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern bisher nicht auf derartigen Automaten durchführbar.

In dem Patent DE 43 28 070 C1 ist ein Typ eines Rezeptorbindungsassays, der nach der Coated-Tube-Technik arbeitet, beschrieben, bei dem die Schwierigkeit der Herstellung von

- 6 -

markierten bzw. immobilisierten funktionalen Rezeptorpräparationen dadurch umgangen wird, daß man an die Festphase Bestandteile eines kompetitierenden Reaktionssystems bindet, das gewissermaßen einen "Schatten" der eigentlichen Rezeptorbindungsreaktion darstellt. Für die Schaffung von Assays für die klinische Routinediagnostik hat sich das offenbarte Verfahrensprinzip jedoch als zu kompliziert und daher wenig praktikabel erwiesen. Auf die allgemeinen Ausführungen in der genannten Patentschrift zur Problematik von Rezeptorbindungsassays im allgemeinen und von solchen zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern im speziellen wird ergänzend ausdrücklich Bezug genommen.

Aus der EP-B-0 488 170 sind ferner zellfreie Rezeptorbindungs-
tests bekannt, bei denen rekombinante Fusionsrezeptoren aus
einem aminoterminalen Rezeptorprotein und einem Trägerprotein,
insbesondere dem konstanten Teil (Fc) der schweren Kette eines
Immunglobulins, eingesetzt werden, die mittels eines Antiserums
oder eines monoklonalen Antikörpers an eine feste Phase
gekoppelt sind. Die diskutierten Rezeptoren gehören nicht zur
Klasse der hochmolekularen G-Protein gekoppelten Glykoprotein-
Rezeptoren. Ferner ist eine Immobilisierung durch Bindung eines
Trägerproteins, das der Fc-Teil eines Immunglobulins ist, für
Rezeptorbindungsassays, mit deren Hilfe Autoantikörper bestimmt
werden sollen, wenig geeignet, da die Autoantikörper selbst zu
den Immunglobulinen gehören und an das Immobilisierungssystem
binden können.

Aus der DE 41 20 412 C1 ist ferner ein Verfahren zur Bestimmung
von Autoantikörpern bekannt, bei dem die Störung eines
Sandwich, der aufgebaut wird aus einem immobilisierten
spezifischen Antikörper, einem kruden Autoantigen in Form eines
geeigneten Organextrakts, insbesondere TPO, und einem markierten
weiteren Antikörper durch in der Probe vorhandene Auto-
antikörper gegen das Autoantigen zur Bestimmung genutzt wird.
In einer Probe vorhandene Autoantikörper können im Sinne einer
Störung prinzipiell mit jeder einzelnen oder auch beiden

- 7 -

immunologischen Bindung(en) wechselwirken, die am Aufbau des vollständigen Sandwich beteiligt sind. Wegen der geschilderten Empfindlichkeit von Rezeptoren und dem Fehlen von Autoantikörpern mit der benötigten Selektivität war es bisher nicht möglich, dieses Verfahrensprinzip auf Fälle zu übertragen, bei denen das Autoantigen ein Rezeptor ist und der markierte Bindungspartner ein markiertes Hormon wie z.B. TSH.

Nachdem die Molekülstruktur des TSH-Rezeptors aufgeklärt war, wurden mit dem Ziel der Aufklärung der für die TSH-Bindung und die Antikörperbindung zuständigen Epitope des TSH-Rezeptors von zahlreichen Arbeitsgruppen monoklonale und polyklonale Antikörper gegen humane rekombinante TSH-Rezeptoren, gegen den (ohne das Signalpeptid 398 Aminosäuren umfassenden) N-terminalen extrazellulären Teil solcher Rezeptoren und gegen Konjugate kürzerer Rezeptorpeptid-Teilsequenzen hergestellt (vgl. z.B. N.G. Morgenthaler et al., Exp Clin Endocrinol Diabetes 104 (1996) Suppl 4, S.56-59; Seetharamaiah GS et al., Endocrinology 134, No. 2, S. 549-554 (1994); Desai RK et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 77:658-663, 1993; Dallas JS et al., Endocrinology 134, No. 3, S. 1437-1445 (1994); Johnstone AP et al., Mol. Cell. Endocrinol. 105 (1994), R1-R9; Seetharamaiah GS et al., Endocrinology 136, No. 7, S. 2817-2824 (1995); Nicholson LB et al., J. Mol. Endocrinol. (1996) 16, S. 159-170; Ropars A et al., Cell. Immunol. 161, S.262-269 (1995); Ohmori M et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, No.1 (1991), S.399-403; Endo T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, No.3 (1991), S.1035-1041; Costagliola S et al., Endocrinology 128, No.3, S.1555-1562, 1991; Marion S et al., Endocrinology 130, No.2, S.967-975 (1992); J. Sanders et al., J. Endocrinol. Invest. 19 (Suppl. No.6); 1996 und weitere, in den genannten Literaturstellen zitierte Veröffentlichungen). Die verschiedenen Antikörper wurden auf ihr Bindungsverhalten gegenüber dem TSH-Rezeptor bzw. rekombinant erzeugten Teilsequenzen davon und insbesondere auch im Hinblick auf ihre Fähigkeit, die Bindung von TSH an verschiedene Formen bzw. Fragmente des TSH-Rezeptors zu stören, geprüft. Da die verschiedenen polyklonalen oder

- 8 -

monoklonalen Antikörper durch Immunisierung unterschiedlicher Tiere und/oder unter Verwendung von rekombinantem Material aus unterschiedlichen Expressionssystemen erzeugt worden waren und außerdem bei den Bindungstests häufig rekombinant erzeugte TSH-Rezeptoren unterschiedlichen Ursprungs bzw. Teilpeptide davon verwendet wurden, und da es sich ferner herausstellte, daß für die Bindung zahlreicher Antikörper die Glykolisierung und/oder korrekte Faltung der Rezeptorpeptide entscheidend sein dürfte, ist die Epitopstruktur von nativen TSH-Rezeptoren und das epitopspezifische Bindungsverhalten der in polyklonalen Autoantikörperpopulationen vorkommenden Autoantikörpern noch nicht umfassend geklärt.

In der Veröffentlichung Dallas JS et al., Endocrinology 134, No. 3, S. 1437-1445 (1994) wird beispielsweise ein mit Hilfe des Baculovirus/Insektenzellen-Expressionssystems hergestellter partieller rekombinanter TSH-Rezeptor, der die Aminosäuren der extrazellulären Domäne des humanen TSH-Rezeptors ohne das N-terminale Signalpeptid aufweist, dazu verwendet, Kaninchen zu immunisieren, und aus den gebildeten Immunglobulinfraktionen werden affinitätschromatographisch unter Verwendung synthetischer Peptide mit jeweils ca. 20 Aminosäuren spezifische Antikörperfraktionen gewonnen. Diese werden dann u.a. auf ihre Eignung untersucht, in einem kommerziellen Rezeptorbindungsassay die Bindung von TSH einen solubilisierten porcinen TSH-Rezeptor zu blockieren. Die Antikörper zeigten keine stimulierende Aktivität.

In der Veröffentlichung Seetharamaiah GS et al., Endocrinology 136, No. 7, S. 2817-2824 (1995) wird beschrieben, wie der gleiche partielle rekombinante TSH-Rezeptor wie in der vorstehenden Veröffentlichung zur Immunisierung von Mäusen und zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen einzelne Epitope des TSH-Rezeptors nach Standardtechniken eingesetzt wurde. Eine ähnliche Vorgehensweise ist beschrieben in Nicholson LB et al., J. Mol. Endocrinol. (1996) 16, S. 159-170.

- 9 -

Gemäß Seetharamaiah GS et al., Endocrinology 134, No. 2, S. 549-554 (1994) wird ein wie vorstehend hergestellter partieller rekombinanter TSH-Rezeptor nachträglich gefaltet und nunmehr auf seine Eignung getestet, radioaktiv markiertes TSH zu binden. Dazu wird er in flüssiger Phase mit radioaktiv markiertem TSH umgesetzt. Um den entstandenen Komplex möglichst quantitativ aus der Reaktionsmischung abzutrennen, wird dann als Teil eines Fällungssystems ein Antikörper zugesetzt, der durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Konjugat eines Teilpeptids, das die Aminosäuren 357 bis 372 der vollständigen TSH-Rezeptorsequenz enthält, erzeugt wurde und von dem festge stellt worden war, daß er die Bindung von TSH an den ungefaltenen partiellen rekombinanten TSH-Rezeptor nicht inhibierte (Desai RK et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 77:658-663, 1993). Der zugesetzte Antikörper bzw. die ihn und gebundenes radioaktiv markiertes TSH enthaltenden Komplexe werden dann mit Hilfe von Protein A, das unspezifisch an jegliche Antikörper bindet, ausgefällt. Unter den Versuchsbedingungen scheint die Bindung von Protein A an den rezeptorgebundenen Antikörper die gleichzeitige TSH-Bindung nicht zu beeinträchtigen.

Die mit Antikörpern gegen rekombinante TSH-Rezeptoren oder deren Teile gewonnenen Erkenntnisse führten zu dem Vorschlag, zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern ein drittes, 25 an sich bekanntes Verfahrensprinzip in Form eines Immunpräzipitationsassays zu nutzen, bei dem als Reagens zur Fällung eine Präparation eines extrazellulären Teils eines rekombinanten, durch Einbau von ³⁵S-markiertem Methionin markierten TSH-Rezeptors verwendet wird. Bei einem solchen Assay besteht weder eine Selektivität für TSI noch für TBII. (N.G.Morgen thaler et al., Exp Clin Endocrinol Diabetes 104 (1996) Suppl 4, S.56-59). Die Herstellung des markierten Rezeptors durch in vitro-Translation ist jedoch außerordentlich aufwendig und teuer, und es gibt keine Meßgeräte, die für eine klinische Routinemessung der von ³⁵S emittierten Strahlung geeignet sind. Das Verfahren ist daher als Meßverfahren für die klinische Routinediagnostik nicht geeignet.

- 10 -

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen kompetitiven Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern zu schaffen, der die beschriebenen Nachteile derartiger kompetitiver Rezeptorbindungsassays des Standes der Technik nicht aufweist.

Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen verbesserten kompetitiven Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern zu schaffen, bei dem es möglich ist, die aus den Reaktionspartnern des Bestimmungsverfahrens gebildeten TSH-Rezeptor-Komplexe zur Messung an einer üblichen Festphase zu immobilisieren und die bestehenden Einschränkungen bezüglich verwendbarer Markierungen zu überwinden, so daß auch eine automatisierte Durchführung derartiger Rezeptorbindungsassays möglich wird.

Insbesondere ist es ferner Aufgabe der vorliegenden Erfindung, derartige verbesserte kompetitive Rezeptorbindungsassays zum Nachweis von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern so zu gestalten, daß gegenüber derartigen Assays des Standes der Technik eine erhöhte klinische Wertigkeit erhalten wird.

Es ist ferner Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die zur Durchführung derartiger besserter Rezeptorbindungsassays in der klinischen Routinediagnostik erforderlichen Reagenzienätsze (Kits) zu schaffen.

Die genannten Aufgaben werden bei einem kompetitiven Rezeptorbindungsassay gemäß Oberbegriff von Anspruch 1 wenigstens teilweise durch Radiorezeptorassays gelöst, die dem Kennzeichen des Anspruchs 1 wiedergegebenen Merkmale aufweisen.

Vorteilhafte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen verbesserten Rezeptorbindungsassays sind den Unteransprüchen zu entnehmen, insbesondere in Verbindung mit den nachfolgenden Erläuterungen in der vorliegenden Beschreibung.

- 11 -

Die Aufgabe der Schaffung eines entsprechenden Reagenziensatzes wird durch einen Reagenziensatz für die Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens gelöst, der wenigstens jeweils einen der Bestandteile (i), (ii) und (iii) gemäß Anspruch 15 enthält.

5

Um verschiedene mögliche Ausführungsformen für den Rezeptorbindungsassay der vorliegenden Erfindung abzudecken, wird in Anspruch 1 sowohl zur Beschreibung bekannter Merkmale derartiger Rezeptorbindungsassays als auch zur Charakterisierung solcher Merkmale, durch die sich ein erfindungsgemäßer Rezeptorbindungsassay von einem des Standes der Technik unterscheidet, eine verallgemeinernde Ausdrucksweise verwendet, die einleitend wie folgt ergänzend erläutert wird:

15

Wie im einleitenden Teil erläutert wurde, enthalten die bekannten kompetitiven Rezeptorbindungsassays, die alle als Radiorezeptorassays ausgestaltet sind, folgende Assaybestandteile:

20

Einen solubilisierten TSH-Rezeptor (i), insbesondere einen aus tierischen Schilddrüsenmembranen gewonnenen solubilisierten nativen tierischen (porcinen) TSH-Rezeptor.

25

Ferner enthalten die bekannten Radiorezeptorassays radioaktiv markiertes bovines TSH (ii), das mit TSH-Rezeptor-Autoantikörpern aus einer Serumprobe (TBII) um gemeinsame Bindungsstellen an dem verwendeten TSH-Rezeptor konkurriert. Da diese Kompetition diejenige ist, die bisher von primärer Bedeutung ist und auch eine Erfassung des überwiegenden Anteils auftretender Autoantikörper, nämlich 80 bis 90%, ermöglicht, fällt das markierte TSH des Standes der Technik unter die in Anspruch 1 verwendete Definition "primärer Kompetitor". Diese Definition umfaßt jedoch auch andere Formen von "primären Kompetitoren", deren Verwendung erstmals durch die vorliegende Erfindung ermöglicht wurde. So können als Kompetitoren für TBII oder gegebenenfalls auch andere Autoantikörperfraktionen auch

30

35

markierte selektive Antikörper gegen den TSH-Rezeptor verwendet werden, wie sie nachfolgend näher beschrieben werden. Ferner soll, aufgrund der Kompetition mit TBII, auch ein festphasen gebundenes TSH die Definition "primärer Kompetitor" erfüllen können.

5

10

15

20

25

30

35

Wie ebenfalls eingangs erläutert wurde, werden im Stand der Technik die Komplexe aus dem TSH-Rezeptor und daran gebundenen Bestandteilen der Reaktionsmischung, d.h. markiertem TSH und Autoantikörpern, mittels eines Fällungsreagenzes aus der Reaktionsmischung ausgefällt und durch Zentrifugieren davon abgetrennt. Im Sinne des Oberbegriffs von Anspruch 1 ist das Fällungsreagenz als Mittel gemäß (iii) anzusehen. Bei einem erfundungsgemäßen kompetitiven Rezeptorbindungsassay entspricht einem derartigen Mittel (iii) ein festphasengebundener Umsetzungspartner, der in erster Linie ein an einer Festphase immobilisierter spezifischer TSH-Rezeptor-Antikörper ist, der jedoch gemäß einer "spiegelverkehrten" Ausführungsform auch ein festphasengebundenes TSH sein kann.

Es ist eine für die vorliegende Erfindung wesentliche Erkenntnis, daß es möglich ist, mit Hilfe immobilisierter selektiver Antikörper, die spezifisch gegen eine geeignete Teilsequenz des TSH-Rezeptors gerichtet sind, eine Immobilisierung auch eines nativen TSH-Rezeptors (d.h. eines humanen, tierischen oder auch rekombinanten TSH-Rezeptors, dessen Faltung/Glykosylierung einem natürlich vorkommenden TSH-Rezeptor wenigstens im wesentlichen entspricht) aus solubilisierten TSH-Rezeptor Präparationen beliebiger Art möglich ist, ohne daß die Bindungsfähigkeit des TSH-Rezeptors gegen TBII-Autoantikörper und markiertes TSH nennenswert beeinträchtigt ist. Mit dieser Erkenntnis wurde somit die Voraussetzung geschaffen, einen Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern so durchzuführen, daß die Bestimmung der Menge des gebundenen markierten Kompetitors, z.B. des primären Kompetitors radioiodmarkiertes TSH, in festphasengebundener Form erfolgen kann. Überraschenderweise zeigte es sich jedoch

- 13 -

ferner, daß es durch eine Immobilisierung des TSH-Rezeptors an eine Festphase mit Hilfe selektiver TSH-Rezeptor-Antikörper möglich ist, die klinische Wertigkeit von kompetitiven Rezeptorbindungsassays zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-
5 Autoantikörpern erheblich zu verbessern. Wie nachfolgend noch genauer erläutert wird, zeigte es sich nämlich, daß es bei einer geeigneten Wahl des an die Festphase gebundenen spezifischen Antikörpers dazu kommt, daß das Bestimmungssystem mindestens eine weitere Bindungsstelle enthält, um die Auto-
10 antikörper aus der Probe kompetieren können.

Wenn der festphasengebundene Antikörper so gewählt wird, daß er als "sekundärer Kompetitor" wirkt, der mit anderen Auto-antikörpern der Probe als die durch Kompetition mit dem "primären Kompetitor" erfaßten TBII kompetiert, kommt es zu einer Erhöhung der klinischen Wertigkeit. Es wird nämlich ein Meßsystem gebildet, das als Analogie zu dem in DE 41 20 412 in Fig. 3 schematisch dargestellten Bestimmungssystem angesehen werden kann, bei dem es durch heterogene polyklonale Auto-
20 antikörper aus einer Patientenprobe zu einer doppelten Störung an unterschiedlichen Bindungsstellen eines Sandwich kommt. Da eine derartige Störung genügt, damit eine Bindung der Markierung an die Festphase verhindert wird, kommt es zu einer Erweiterung des Meßbereichs und einer Erhöhung der Empfindlichkeit.
25 Die genannte Variante unter Verwendung zweier Antikörper und eines kruden Antigens wird auch von dem US-Patent 5,501,955 erfaßt.

Es zeigte sich nunmehr überraschend, daß nach dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung von z.B. einem spezifischen Antikörper, der gegen ein synthetisches Peptid mit den Aminosäuren 20 bis 39 der Aminosäuresequenz des vollständigen TSH-Rezeptors (einschließlich Signalpeptid) erzeugt worden war, alle aufgrund klinischer Symptome als Morbus Basedow-Patienten eingestufte Patienten als Autoantikörper-positiv erfaßt wurden, obwohl mit dem herkömmlichen Radiorezeptorassay nur 80% als positiv ermittelt worden waren. Es ist somit durch Verwendung

eines "sekundären Kompetitors", der mit anderen Autoantikörpern als TBII kompetiert, die bei Morbus Basedow auftreten, möglich, die klinische Wertigkeit des Rezeptorbindungsassays für die Diagnose des Morbus Basedow erheblich zu verbessern.

5

Der "sekundäre Kompetitor" kompetiert dabei vorzugsweise mit im Zellstimulationstest als stimulierend erfaßten Autoantikörpern (TSI-Autoantikörpern), die mangels Kompetition mit TSH durch den herkömmlichen Radiorezeptorassay nicht erfaßt werden.

10

Es ist jedoch nicht erforderlich, daß die Autoantikörper, mit denen der "sekundäre Kompetitor" kompetiert, tatsächlich stimulierend wirken und damit die klinischen Symptome des Morbus Basedow verstärken. Die von dem "sekundären Kompetitor" kompetierten Autoantikörper können auch einer Autoantikörper-Subpopulation angehören, die blockierend wirkt oder für das eigentliche Krankheitsgeschehen unwichtig ist. Solange eine derartige Autoantikörper-Subpopulation stets oder häufig im Serum von Morbus Basedow-Patienten auftritt, wird die klinische Wertigkeit des Rezeptorbindungsassays gegenüber dem herkömmlichen Radiorezeptorassay erhöht, der nur TBII-Autoantikörper erfaßt.

15

Als selektive Antikörper, die bevorzugte "sekundäre Kompetitoren" bilden, kommen somit insbesondere solche in Frage, die gegen Abschnitte des TSH-Rezeptors gerichtet sind, die nicht an der TSH-Bindung beteiligt sind, gegen die jedoch beim Morbus Basedow Autoantikörper gebildet werden. Die bisherigen Untersuchungen unter Verwendung von affinitätschromatographisch gereinigten polyklonalen oder als monoklonale Antikörper hergestellten Antikörpern führten dazu, daß einige Abschnitte des TSH-Rezeptors als geeignete Bindungsregionen für derartige selektive Antikörper besonders in Betracht kommen. Bei der Interpretation der bisherigen Literaturdaten ist jedoch zu beachten, daß die meisten selektiven Antikörper gegen rekombinant erzeugte TSH-Rezeptorpeptide oder synthetische Teilpeptide erzeugt wurden und daher wahrscheinlich sequenzieller Natur sind. Ein Großteil der in der Natur beschriebenen

20

25

30

35

- 15 -

Antikörper erwies sich ferner im Zellstimulationstest als wirkungslos. Das deutet darauf hin, daß trotz einer Kompetition mit Autoantikörpern aus Seren eine Gleichsetzung der künstlich erzeugten Antikörper mit den zu bestimmenden Autoantikörpern nicht möglich ist. Das Bindungsverhalten der künstlich erzeugten Antikörper an native TSH-Rezeptor-Präparationen kann sich ferner aufgrund der Faltung des nativen TSH-Rezeptors und seiner Glycosylierung vom Bindungsverhalten an synthetische Peptide oder rekombinant erzeugte TSH-Rezeptor-Fragmente unterscheiden. In Kenntnis der Lehre der vorliegenden Erfindung ist es jedoch im Einzelfall schon in relativ einfachen Routineversuchen möglich, die Eignung spezieller spezifischer Antikörper für das erfindungsgemäße Verfahren und ihre Fähigkeit, als "sekundärer Kompetitor" zu wirken, festzustellen.

Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden durchgeführt unter Verwendung eines immobilisierten spezifischen Antikörpers, von dem bekannt ist, daß er an ein Peptid aus dem Bereich der Aminosäuren 20 bis 39 des vollständigen TSH-Rezeptors bindet, sowie von markiertem bovinem TSH als herkömmlicher Tracer ("primärer Kompetitor"). Der verwendete Antikörper war ein monoklonaler Antikörper, der nach Immunisierung mit Hilfe eines Konjugats aus dem entsprechenden synthetischen Peptid nach der üblichen Hybridomtechnik selektiert und hergestellt worden war. In der Literatur wurden verschiedene polyklonale oder monoklonale spezifische Antikörper beschrieben, die ebenfalls an die gleiche Region oder überlappende Regionen des aminoterminalen Endes der extrazellulären Domäne des TSH-Rezeptors binden (vgl. Dallas J.S. et al., Endocrinology 134, No. 3, S. 1437-1445 (1994); Seetharamaiah G.S. et al., Endocrinology 136, No. 7, S. 2817-2824 (1995); Nicholson LB et al., J. Mol. Endocrinol. (1996) 16 S. 259-170; Ohmori, M. et al., J. Endocrinol. (1992) 135, S. 479-484; Endo, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, S. 145-150 (1991); Hirooka, Y. et al., Med. Sci. Res. 1992, 20, S. 639-640). Die in den genannten Literaturstellen beschriebenen Herstellungstechniken

- 16 -

und Antikörpertypen kommen grundsätzlich als Austausch für den in den Versuchen konkret verwendeten Antikörper in Frage, wobei jedoch zu beachten ist, daß bekannt ist, daß Antikörper gegen eng benachbarte Sequenzen des TSH-Rezeptors zu ganz unterschiedlichen Antikörpertypen gehören können.

Als Alternativen zu dem in den Beispielen verwendeten Antikörper, der gegen die Aminosäuren 20 bis 39 des humanen TSH-Rezeptors gerichtet ist, kommen auch Antikörper in Frage, die beispielsweise gegen die Regionen 287 bis 301, 361 bis 380 oder 739 bis 758 erzeugt wurden. Die speziellen Eigenschaften sind jedoch im Einzelfalle in Anlehnung an die nachfolgend beschriebenen Versuche zu prüfen.

Wenn man noch stärker von dem ursprünglichen Assaydesign des herkömmlichen Radiorezeptorassays abweicht und anstelle von radioaktiv markiertem TSH einen weiteren markierten selektiven Antikörper verwendet, kann die obige Unterscheidung von "primärem Kompetitor" und "sekundärem Kompetitor" weniger eindeutig werden bzw. sogar völlig an Bedeutung verlieren. Am Assayprinzip des erfindungsgemäßen Rezeptorbindungsassays sowie an der Tatsache, daß auch solche Assays in den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung fallen, ändert das nichts.

Dadurch, daß das erfindungsgemäße Verfahren eine Immobilisierung des in der Meßlösung gebildeten TSH-Rezeptor-Komplexes mit einer direkt daran gebundenen Markierung oder einer nach der Immobilisierung eingeführten Markierung ermöglicht, und daß ferner Reagenzien mit anderen Markierungen als Radionukliden verwendet werden können, kann die praktische Handhabung von TSH-Rezeptor-Autoantikörper-Bestimmungsverfahren sehr viel besser als bisher möglich an Anforderungen der klinischen Praxis angepaßt werden. Auch die Inkubationsschemata können variiert werden, und das in den nachfolgenden Beispielen beschriebene Inkubationsschema erscheint nicht mehr zwingend erforderlich.

- 17 -

Als Festphasen können Kunststoffoberflächen, Mikropartikel, Magnetpartikel, Filter, Polymergelmaterialien und andere bekannte Festphasenträger eingesetzt werden. Die Möglichkeit, mit markierten Autoantikörpern und immobilisiertem TSH (bezüglich der Bindungsfähigkeit von TSH-Rezeptoren an immobilisiertes TSH vgl. Leedman, P.J. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 69; S. 134-141, 1989) zu arbeiten, wird die Anwendungsbreite des Assays insbesondere auch im Hinblick auf eine beliebige Wahl geeigneter direkter oder indirekter Markierungen erheblich erhöht. Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden TSH-Rezeptor-Autoantikörperassays auch automatisierbar. So kann das Assaydesign so angepaßt werden, daß es an bekannten automatisierten Systemen durchführbar ist (vgl. z.B. Elecsys-System der Firma Boehringer Mannheim oder ACS 180-System von Ciba Corning). Bei derartigen automatisierten Systemen wird im Rahmen einer automatischen Abarbeitung der Proben pipettiert, dann können Magnetpartikel, die mit einem geeigneten spezifischen Antikörper gegen den TSH-Rezeptor oder mit TSH beschichtet sind, in Vormischung mit markiertem TSH oder einem beliebig markierten Antikörper (z.B. Rutheniumkomplex- bzw. Acridiniumester-markiert) zugemischt werden, und abschließend erfolgt die Zugabe eines prinzipiell beliebigen geeigneten TSH-Rezeptor-Materials. Nach der Inkubation ist die übliche Fest-Flüssigtrennung möglich, und anschließend kann das Signal, gegebenenfalls nach Signalauslösung durch Zugabe geeigneter Reagenzien, bestimmt werden. Die beispielhaft angegebene Pipettierschrittfolge ist dabei variabel.

Nachfolgend wird das erfindungsgemäße Verfahren anhand eines konkreten Ausführungsbeispiels unter Bezugnahme auf zwei Figuren noch näher erläutert.

Dabei zeigen:

Figur 1 eine auf übliche Weise erhaltene Standardkurve für die im nachfolgenden Ausführungsbeispiel beschriebene Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens;

- 18 -

und

Figur 2 eine Gegenüberstellung der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und dem herkömmlichen Radiorezeptorassay (TRAK-Assay[®] der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH) erhaltenen Meßergebnisse bei der Messung eines Kollektivs von Morbus Basedow-Patienten.

Versuchsbeschreibung

10

Materialien:

Im Rahmen der nachfolgend beschriebenen Versuche wurden verschiedene kommerziell erhältliche Materialien verwendet, und zwar insbesondere Komponenten des TRAK-Assay[®] der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH, eine NAP25-Entsalzungssäule der Firma Pharmacia zur Aufreinigung des für die Immobilisierung vorbereiteten Antikörpers, Carbolink-Material der Firma Pierce als Festphasen-Trägermaterial sowie Natriumperjodat der Firma Fluka.

20

1. Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen den TSH-Rezeptor

Es wurden verschiedene monoklonale Antikörper gegen ausgewählte Peptide des hTSH-Rezeptors nach Verfahren des Standes der Technik hergestellt (s.o.). Für die weiteren Untersuchungen wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der gegen ein Peptid gerichtet ist, das den Aminosäuren 20 bis 39 des vollständigen humanen TSH-Rezeptors (Aminosäuresequenz GGMGCSSPBCECHQEEDFRV) gerichtet ist.

2. Herstellung von festphasengebundenen monoklonalen Antikörpern

35 250 mg Perjodat werden in 20 ml einer 1:10 mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung; 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH 7,5) verdünnten Asciteslösung, die den oben genannten monoklo-

- 19 -

nalen Antikörper enthält, gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionslösung wird nach Vorschrift des Herstellers über eine NAP25-Entsalzungssäule (Pharmacia) entsalzt. Das entsalzte Protein wird mit in PBS gewaschenem Carbolink-Material vermischt (10 ml).

Nach einer Inkubation über Nacht unter ständigem Umschütteln bei 4°C wurden 0,5 ml des erhaltenen Gels mit dem daran gebundenen monoklonalen Antikörper in Kunststoffsäulen (0,5 x 10 4 cm) gefüllt und mit 25 mM Natriumcitratpuffer, pH 2,5 gewaschen (Waschvolumen 2 ml). Die Säulen wurden in PBS (2 ml) äquilibriert und dann für die weiteren Untersuchungen verwendet.

15 3. Mit Hilfe der beschriebenen Säulen wurde unter Verwendung von Komponenten des TRAK-Assays[®] (B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH) ein Radiorezeptorassay durchgeführt

Die Durchführung des Radiorezeptorassays (Erstellung der Standardkurven, Messung von Patientenproben) erfolgte entsprechend den Vorschriften für die Durchführung des TRAK-Assays[®]. Dabei wurde folgendes Pipettierschema angewandt:

25 Es werden 50 µl der Probe pipettiert.

Anschließend werden 50 µl solubilisierter porciner TSH-Rezeptor dazupipettiert.

30 Es wird 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es werden 100 µl Tracer (radiojodiertes TSH) zupipettiert.

Der erhaltene Reaktionsansatz wird auf die mit dem monoklonalen Antikörper wie oben beladene Festphase (Säule mit Carbolink-Material) überführt.

Der Reaktionsansatz wird eine Stunde bei Raumtemperatur

- 20 -

inkubiert.

Die Säule wird mit 2 ml PBS gewaschen.

5 Die an die Festphase gebundene Radioaktivität wird in einem Gammacounter vermessen, und zwar entweder unter direkter Verwendung der Säule mit Festphase oder nach Eluierung der gebundenen Proteine mit 1 ml 25 mM Natrium-citratpuffer, pH 2,5.

10 Zur Erstellung einer Standardkurve für die Auswertung der Meßergebnisse von Patientenserien wurde entsprechend verfahren, wobei die Standards aus dem kommerziellen TRAK-Assay[®], erweitert um einen Standard, der 2000 U TSH/ml enthält, verwendet wurden.

15

Ergebnisse:

Unter Verwendung der Standards wurde eine Standardkurve (Fig. 20 1) erhalten, die der eines üblichen TRAK-Assays[®] entsprach, d.h. steigende Konzentrationen an zugesetztem unmarkiertem TSH 25 führten zu einer Verringerung der gebundenen Radioaktivität.

Bei der Vermessung von Serumproben von Morbus Basedow-Patienten 25 im kommerziellen TRAK-Assay[®] und nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Es wurden Seren von 45 gesunden Kontrollpersonen und von 39 30 Morbus Basedow-Patienten mit dem herkömmlichen TRAK-Assay[®] nach dem erfindungsgemäßen Verfahren vermessen. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Die Seren der Morbus Basedow-Patienten entstammen Proben vor 35 der ersten Therapie oder innerhalb von sechs Wochen nach Beginn therapeutischer Maßnahmen.

- 21 -

Tabelle 1

Nr.	Kontrollkollektiv (U/l)			M. Basedow (U/l)		
	TRAK Assay	erf.gem. Verfahren		TRAK Assay	erf.gem. Verfahren	
1	p	12,3	p	42,3	p	31,3
2	n	1,2	n	3	p	27,7
3	n	7,2	n	6,1	p	44,2
4	n	3,8	n	15,5	p	41,5
5	n	7,2	n	936	p	966
6	n	1,7	n	15,5	p	47,4
7	n	3,4	n	108,3	p	164,8
8	n	4,4	n	16,4	p	26,7
9	n	3,8	n	26,3	p	84,7
10	n	2,5	n	9,4	p	58,9
11	n	4,7	n	56,3	p	239,2
12	n	2	n	3,4	p	17,3
13	n	10,6	n	19,5	p	34,1
14	n	1,1	n	13,2	p	229,1
15	n	3,9	n	40,3	p	29,8
16	n	2,1	n	15	p	25
17	n	2,5	n	23,6	p	271,7
18	n	3	n	18,6	p	46,6
19	n	4,8	n	697	p	671
20	n	1,8	n	60,8	p	150,6
21	n	3,1	n	86,5	p	133,7
22	n	9,3	n	19,3	p	27,3
23	p	16,6	p	26,8	p	47,5
24	n	2,1	n	61,4	p	255,9
25	n	4,9	n	49,3	p	135,6
26	n	4,9	n	149	p	439,5
27	n	5	n	16,7	p	28,6
28	n	1,8	n	176	p	303,2
29	n	2,9	n	1,1	p	14,9
30	n	2,6	n	1,2	p	17,1
31	n	7,9	n	182,3	p	644
32	n	4	n	23,7	p	40,5
33	n	2,5	n	17,8	p	23
34	n	1,9	n	1,3	p	15,6
35	n	1,8	n	95,1	p	77,8
36	n	2,3	n	19,8	p	36
37	n	1,9	n	13,7	p	165
38	n	2,3	n	12,8	p	29,9
39	n	5,7	n	9,8	p	14,7
40	n	6,4	n			
41	n	1,6	n			
42	n	1,6	n			
43	n	1,5	n			
44	n	4	n			
45	n	1,4	n			

cut off 11,0 14,0

p = TSH-Rezeptor-Autoantikörper
positivn = TSH-Rezeptor-Autoantikörper
negativ

Mw	4,09	4,88
1 s	3,18	4,40

Der Mittelwert für die Vermessung der Autoantikörper-freien Seren der Kontrollgruppe (n=45) liegt bei $4,1 \pm 6,4$ (2s) U/ml für den TRAK-Assay[®] und bei $4,8 \pm 8,8$ (2s) U/ml bei dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Um bei beiden Tests eine vergleichbare Spezifität von 95,5% einzuhalten, wurde der "Cut-Off" (Grenzlinie zwischen Werten für negative und positive Proben) für das herkömmliche Verfahren auf 11 U/ml und für das erfindungsgemäße Verfahren auf 14 U/ml festgelegt. Unter Anwendung dieser Cut-Off-Werte wurden im etablierten TRAK-Assay[®]-Radiorezeptor-Verfahren 79,5% der Basedow-Patienten (31 aus 39) als positiv erfaßt.

Eine Vermessung des gleichen Patientenkollektivs nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ergab überraschend, daß 100% der Basedow-Patienten (39 aus 39) Autoantikörper-positiv gemessen wurden. Die im herkömmlichen TRAK-Assay[®] als negativ ermittelten Proben (Proben Nr. 2, 3, 12, 29, 30, 34, 39) wurden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eindeutig als positiv erfaßt.

Darüberhinaus zeigte sich als weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens, daß der überwiegende Teil der Proben mit signifikant stärkerem Meßsignal gefunden wurde. Die erhaltenen Ergebnisse sind zur Verdeutlichung in Fig. 2 graphisch dargestellt.

Durch die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren bestehende zusätzliche Möglichkeit der Störung der Wechselwirkung zwischen festphasengebundenem spezifischen Antikörper und dem TSH-Rezeptor-Komplex mit daran gebundenem radioaktiv markiertem TSH durch in der Probe vorhandene Autoantikörper wird nicht nur die klinische Wertigkeit des Assays für die Morbus Basedow-Diagnostik erhöht, sondern zusätzlich wird auch bei in beiden Tests positiv identifizierten Patienten nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ein wesentlich stärkeres und damit sichereres Meßsignal erzeugt. Die klinische Wertigkeit der Bestimmung von

- 23 -

TSH-Rezeptor-Autoantikörpern, deren Auftreten für einen Morbus Basedow charakteristisch ist, wird somit entscheidend erhöht.

Patentansprüche

- 5 1. Kompetitiver Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in einer biologischen Probe, bei dem man die Probe in einer Reaktionsmischung gleichzeitig oder nacheinander mit (i) einem TSH-Rezeptor in Form einer solubilisierten nativen humanen oder tierischen oder rekombinannten TSH-Rezeptor-Präparation, (ii) einem primären Kompetitor für wenigstens einen Teil der in der Probe zu erwartenden TSH-Rezeptor-Autoantikörper und (iii) einem Mittel für die Abtrennung eines Komplexes aus dem TSH-Rezeptor und daran gebundenen Bestandteilen der Reaktionsmischung von der flüssigen Phase umsetzt, und bei dem man die Anwesenheit und/oder Menge der zu bestimmenden TSH-Rezeptor-Autoantikörper in der biologischen Probe auf der Basis der Menge eines Kompetitors in dem von der flüssigen Phase abgetrennten TSH-Rezeptor-Komplex oder anhand der Restmenge des ungebundenen primären Kompetitors in der Flüssigphase ermittelt, wozu man den Kompetitor in markierter Form einsetzt oder nach der Fest-Flüssig-Trennung markiert,
- 10 dadurch gekennzeichnet, daß man die Umsetzung ferner in Gegenwart mindestens eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers durchführt, der spezifisch gegen eine Peptid-Teilsequenz des TSH-Rezeptors gerichtet ist, und daß dieser spezifische Antikörper als Mittel zur Immobilisierung eines Komplexes aus TSH-Rezeptor und primärem Kompetitor und/oder als sekundärer Kompetitor für einen weiteren Teil der in einer Probe zu erwartenden TSH-Rezeptor-Autoantikörper eingesetzt wird, wobei der primäre oder der sekundäre Kompetitor markiert oder selektiv markierbar ist.
- 15 2. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine spezifische Antikörper in festphasengebundener Form eingesetzt wird und der primäre
- 20
- 25
- 30

- 25 -

Kompetitor markiertes TSH oder ein markierter weiterer TSH-Rezeptor-Antikörper ist, wobei der festphasengebundene spezifische Antikörper im wesentlichen unbeeinflußt von der Bindung des primären Kompetitors an den TSH-Rezeptor bindet.

5

3. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der festphasengebundene Antikörper gleichzeitig ein sekundärer Kompetitor ist, der mit solchen TSH-Rezeptor-Autoantikörpern aus der Probe, die die Bindung des primären Kompetitors an den TSH-Rezeptor nicht behindern, um ein von dem primären Kompetitor nicht erkanntes Epitop kompetiert.

10

4. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der markierte weitere TSH-Rezeptor-Antikörper mit TSH um Epitope des TSH-Rezeptors kompetiert.

15

5. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der festphasengebundene Antikörper als sekundärer Kompetitor mit solchen TSH-Rezeptor-Autoantikörpern aus der Probe kompetiert, deren Auftreten für den Morbus Basedow charakteristisch ist, die jedoch nicht mit TSH kompetieren.

20

6. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die mit dem sekundären Kompetitor kompetierenden TSH-Rezeptor-Autoantikörper zu den stimulierenden Autoantikörpern (TSI) gehören.

25

7. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine Antikörper in markierter Form als sekundärer Kompetitor in der flüssigen Phase eingesetzt wird und daß ein festphasengebundenes TSH als Mittel für die Abtrennung eines Komplexes aus dem TSH-Rezeptor und daran gebundenen Bestandteilen der Reaktionsmischung sowie als primärer Kompetitor eingesetzt wird.

30

35

8. Rezeptorbindungsassay nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine weitere Anti-

- 26 -

körper durch an sich bekannte Immunisierung eines geeigneten Tiers mit einem rekombinanten partiellen TSH-Rezeptor, insbesondere der extrazellulären Domäne oder einer extrazellulären Schlinge der membranverankerten Domäne eines TSH-Rezeptors, und durch affinitätschromatographische Fraktionierung der gebildeten Antikörper unter Verwendung immobilisierter Teilpeptide des zur Immunisierung verwendeten partiellen TSH-Rezeptors hergestellt wurde.

10 9. Rezeptorbindungsassay nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine weitere Antikörper ein durch an sich bekannte Immunisierung eines geeigneten Tiers mit einem rekombinanten partiellen TSH-Rezeptor, insbesondere dem rekombinanten extrazellulären Teil eines TSH-

15 Rezeptors oder einem kürzeren Teilpeptid davon, an sich bekannte Fusion antikörperproduzierender Milzzellen mit Myelomzellen und an sich bekannte Selektion einzelner antikörperproduzierender Hybridzellen und deren Kultivierung hergestellter monoklonaler Antikörper ist.

20

10. Rezeptorbindungsassay nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine weitere Antikörper gegen ein TSH-Rezeptor-Teilpeptid gebildet wurde, das ausgewählt ist aus Peptiden mit den Aminosäuren 20-39, 32-54, 25 287-301, 361-381 oder 739-758 der Aminosäuresequenz des vollständigen TSH-Rezeptors.

30

11. Rezeptorbindungsassay nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Festphase Träger in Form von Partikeln, Teströhren oder Mikrotiterplatten aus Kunststoff oder Glas oder in Form von magnetischen Polymerpartikeln, Polymergelen oder Filtern verwendet und man den mindestens einen Antikörper oder TSH an einen solchen Träger direkt oder indirekt gebunden einsetzt.

35

12. Rezeptorbindungsassay nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Markierung des primären

- 27 -

oder sekundären Kompetitors eine an sich bekannte Markierung verwendet, die ausgewählt ist aus einem Radionuklid, einem Enzym, einem Enzymsubstrat oder einem Bestandteil eines Chemilumineszenz- oder Fluoreszenz-Markierungssystems.

5

13. Rezeptorbindungsassay nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man einen primären oder sekundären Kompetitor einsetzt, der an eine Komponente eines spezifischen Bindungssystems gebunden ist, und daß man den gebildeten TSH-Rezeptor-Komplex durch Umsetzung mit einem Reaktionspartner markiert oder immobilisiert, der die zweite Komponente des spezifischen Bindungssystems aufweist, die an eine detektierbare Markierung oder eine Festphase gebunden ist.

10

15

14. Rezeptorbindungsassay nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die zu bestimmenden TSH-Rezeptor-Autoantikörper rezeptorstimulierende Autoantikörper sind, deren Auftreten in einem Humanserum für den Morbus Basedow charakteristisch ist.

20

15. Reagenziensatz zur Durchführung eines kompetitiven Rezeptorbindungsassays nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß er, neben weiteren üblichen Komponenten eines derartigen Reagenziensatzes, enthält:

25

- (i) eine solubilisierte TSH-Rezeptor-Präparation,
- (ii) markiertes TSH oder einen markierten spezifischen TSH-Rezeptor-Antikörper, und
- (iii) eine Festphasenträger, an den ein spezifischer TSH-Rezeptor-Antikörper oder TSH gebunden ist.

30

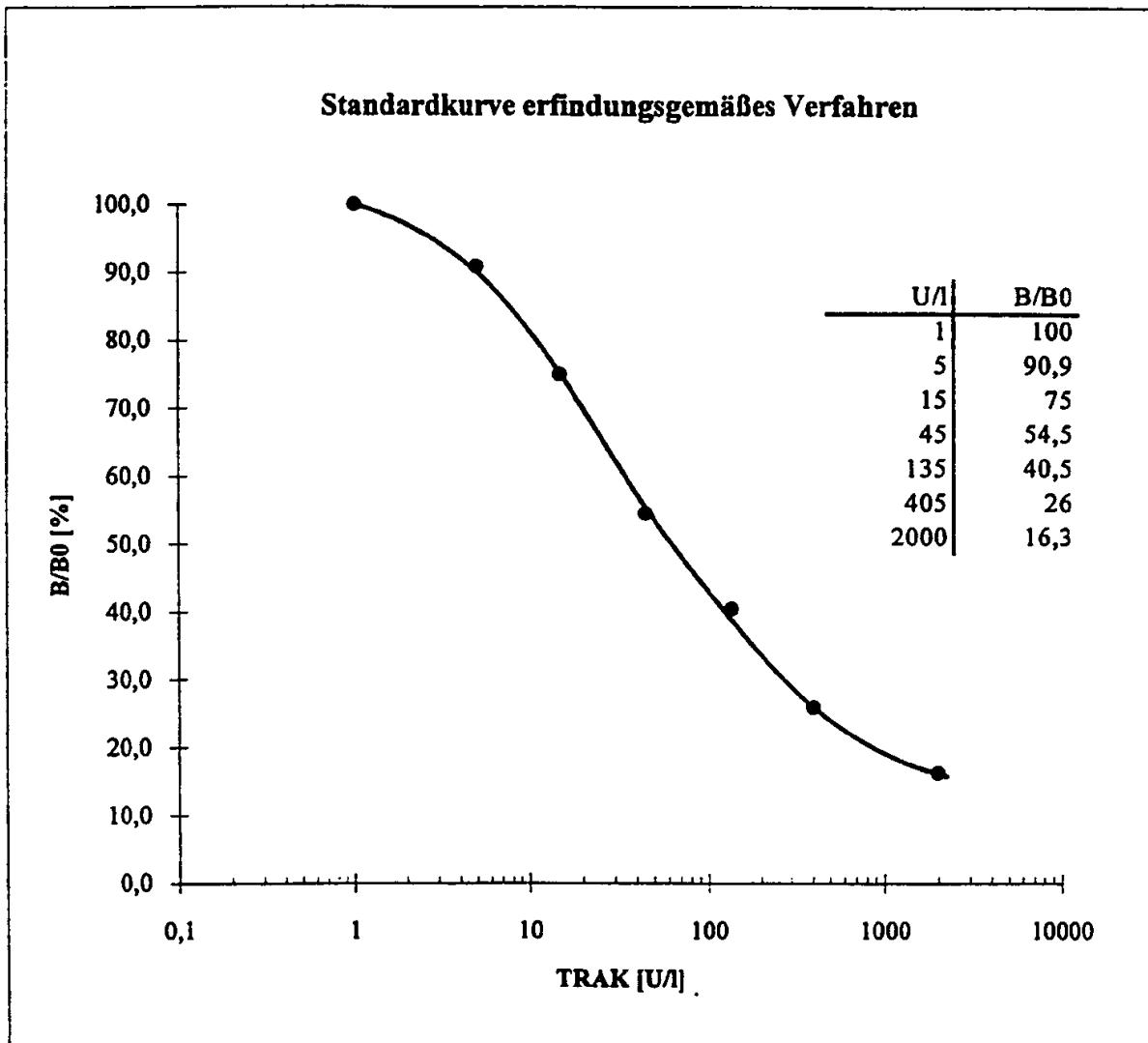


Fig. 1

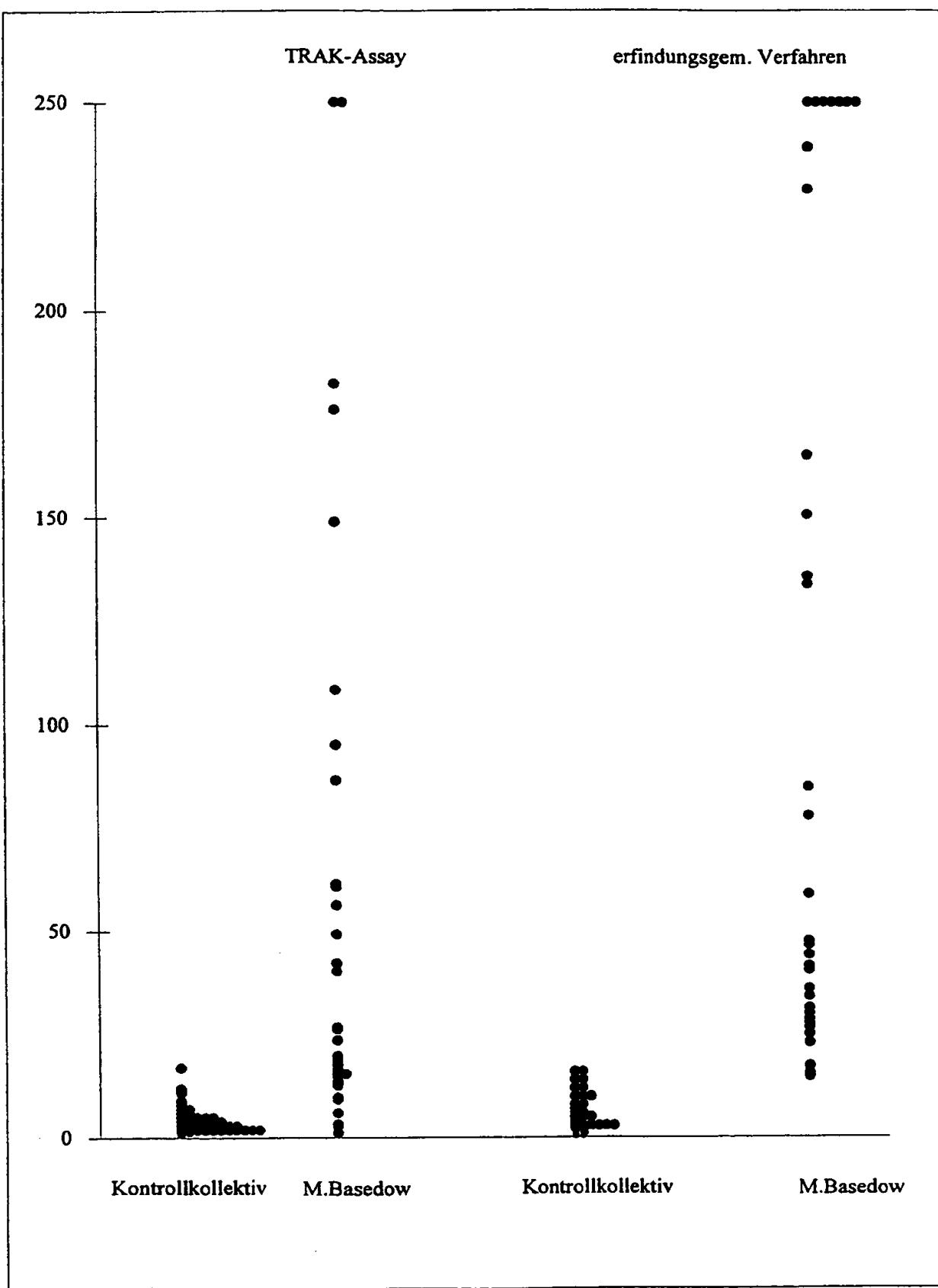


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/06767

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/76 G01N33/68 G01N33/566

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 195 22 171 C (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH) 22 August 1996 see claims see column 3, line 50 - column 4, line 52 ---	1-15
Y	DE 43 28 070 C (HENNING BERLIN GMBH) 24 November 1994 cited in the application see the whole document ---	1-15
Y	DE 41 20 412 C (HENNING BERLIN GMBH) 7 January 1993 cited in the application see the whole document ---	1-15

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 April 1998	29/04/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Routledge, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/06767

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DE BRUIN T W A ET AL: "ANTI THYROTROPIN RECEPTOR ANTIBODIES IN GRAVES DISEASE AS DEMONSTRATED DIRECTLY BY IMMUNO PRECIPITATION ASSAY."</p> <p>ACTA ENDOCRINOL 102 (1). 1983. 49-56.</p> <p>CODEN: ACENA7 ISSN: 0001-5598, XP002061960</p> <p>see the whole document</p> <p>----</p>	1-15
X	<p>YAVIN E ET AL: "MONO CLONAL ANTIBODIES TO THE THYROTROPIN RECEPTOR IMPLICATIONS FOR RECEPTOR STRUCTURE AND THE ACTION OF AUTO ANTIBODIES IN GRAVES DISEASE."</p> <p>PROC NATL ACAD SCI U S A 78 (5). 1981.</p> <p>3180-3184. CODEN: PNASA6 ISSN: 0027-8424,</p> <p>XP002061961</p> <p>see the whole document</p> <p>-----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/06767

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19522171 C	22-08-96	WO 9700447 A EP 0834076 A		03-01-97 08-04-98
DE 4328070 C	24-11-94	AT 160023 T DE 69406679 D DE 69406679 T WO 9506258 A EP 0724726 A JP 2684244 B JP 9500215 T		15-11-97 11-12-97 05-03-98 02-03-95 07-08-96 03-12-97 07-01-97
DE 4120412 C	07-01-93	AT 132976 T DE 59205012 D WO 9300587 A EP 0544869 A ES 2081115 T JP 2675676 B JP 6501103 T US 5501955 A		15-01-96 22-02-96 07-01-93 09-06-93 16-02-96 12-11-97 27-01-94 26-03-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/06767

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 G01N33/76 G01N33/68 G01N33/566			
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK			
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 G01N			
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen			
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)			
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN			
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.	
Y	DE 195 22 171 C (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH) 22.August 1996 siehe Ansprüche siehe Spalte 3, Zeile 50 – Spalte 4, Zeile 52 ---	1-15	
Y	DE 43 28 070 C (HENNING BERLIN GMBH) 24.November 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-15	
Y	DE 41 20 412 C (HENNING BERLIN GMBH) 7.Januar 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-15	
	-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie	
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *V* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *V* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *S* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist	
1	Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche 15.April 1998	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 29/04/1998	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Routledge, B	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nationales Aktenzeichen PCT/EP 97/06767

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ³	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE BRUIN T W A ET AL: "ANTI THYROTROPIN RECEPTOR ANTIBODIES IN GRAVES DISEASE AS DEMONSTRATED DIRECTLY BY IMMUNO PRECIPITATION ASSAY." ACTA ENDOCRINOL 102 (1). 1983. 49-56. CODEN: ACENA7 ISSN: 0001-5598, XP002061960 siehe das ganze Dokument ----	1-15
X	YAVIN E ET AL: "MONO CLONAL ANTIBODIES TO THE THYROTROPIN RECEPTOR IMPLICATIONS FOR RECEPTOR STRUCTURE AND THE ACTION OF AUTO ANTIBODIES IN GRAVES DISEASE." PROC NATL ACAD SCI U S A 78 (5). 1981. 3180-3184. CODEN: PNASA6 ISSN: 0027-8424, XP002061961 siehe das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/06767

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19522171 C	22-08-96	WO 9700447 A		03-01-97
		EP 0834076 A		08-04-98
DE 4328070 C	24-11-94	AT 160023 T		15-11-97
		DE 69406679 D		11-12-97
		DE 69406679 T		05-03-98
		WO 9506258 A		02-03-95
		EP 0724726 A		07-08-96
		JP 2684244 B		03-12-97
		JP 9500215 T		07-01-97
DE 4120412 C	07-01-93	AT 132976 T		15-01-96
		DE 59205012 D		22-02-96
		WO 9300587 A		07-01-93
		EP 0544869 A		09-06-93
		ES 2081115 T		16-02-96
		JP 2675676 B		12-11-97
		JP 6501103 T		27-01-94
		US 5501955 A		26-03-96

THIS PAGE BLANK (USPTO)